

Caracterización de un aislado virulento del virus de las venas amarillas del pepino procedente de Jordania

Luis Galipienso* y José Aramburu (Intitut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Cabriels, Barcelona. * luis.galipienso@irta.es).

Leonardo Velasco (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria (IFAPA), Churriana, Málaga).

Luis Rubio (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia).

Dirk Janssen (IFAPA), La Mojonera, Almería).

El virus de las venas amarillas del pepino (CVYV) causa importantes daños en diversos cultivos de cucurbitáceas, principalmente en pepino. Las medidas de control aplicadas a su insecto vector, la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y el uso de variedades resistentes ha permitido disminuir el impacto de este virus en la agricultura. La selección de variedades resistentes de pepino por parte de las empresas de semillas se realizó empleando aislados locales del virus. Sin embargo, hemos podido comprobar que un aislado de CVYV recogido en Jordania induce síntomas severos en diversos cultivares de pepino comercializados con distintos grados de resistencia frente al virus. Por el contrario, un aislado local recogido en Almería no induce síntomas o a lo sumo, solo induce síntomas suaves en algunas de los cultivares resistentes. El aislado jordano de CVYV muestra importantes diferencias genéticas con respecto al aislado local, por lo que alguno de estos cambios podría ser el responsable del aumento de su virulencia. Cuantificando la concentración viral se ha podido comprobar que existen diferencias en los niveles de acumulación de ambos aislados tanto en plantas de variedades resistentes como susceptibles al virus.

Antecedentes

CVYV es un virus que pertenece al género *Ipomovirus*, dentro de la familia *Potyviridae*. Se transmite por la mosca blanca *Bemisia tabaci* de una manera semipersistente e infecta distintas especies de cucurbitáceas, entre las que destacan el pepino, el melón y la sandía. CVYV induce clorosis nervial, mosaico y distorsión de las hojas, reducción del crecimiento de la planta, necrosis y deformación del fruto, afectando gravemente a la producción. Debido a los daños que produce en los cultivos se le ha incluido en la lista de patógenos de cuarentena de la Organización de Protección Vegetal de Europa y países del Mediterráneo (EPPO)(<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>). Hasta la fecha, CVYV ha sido detectado en diversos países

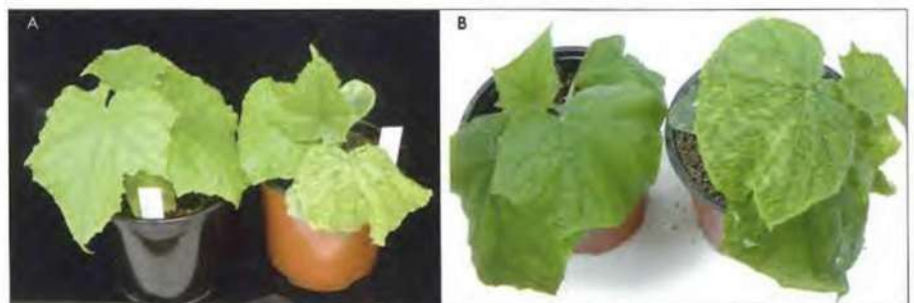


Figura 1. Plantas de pepino de las variedades Kercus® (a) y Alcazaba® (b), con resistencia alta y media a CVYV respectivamente, inoculadas con el aislado de Jordania (derecha) y el aislado local (izquierda).

de la cuenca mediterránea y Oriente Próximo. En España, se detectó por primera vez en el año 2000 en un brote epidémico que afectó a cultivos de pepino y melón en la provincia de Almería (Cuadrado y

col. 2001). A partir de este momento, la incidencia de la enfermedad fue disminuyendo, debido a la aplicación de medidas de control de la mosca blanca y el uso de variedades de pepino con resistencia

a aislados locales del virus. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de variedades comerciales de melón y sandía con resistencias a este patógeno por lo que sigue siendo un factor limitante en el cultivo de cucurbitáceas del sur de España. Estudios filogenéticos realizados con aislados locales de CVYV han mostrado que éstos tienen una alta homología genética, por lo cual se piensa que se dispersaron en el territorio español a partir de una única introducción (JANSSEN y col. 2007). Por otra parte, hay muy poca información sobre el origen, la naturaleza y la variabilidad de aislados de CVYV de diferentes zonas geográficas.

Con respecto a la naturaleza y características biológicas de aislados de CVYV de fuera de España, hasta la fecha solo hay una referencia acerca de un aislado procedente de Jordania, al que se atribuye una mayor severidad en los síntomas inducidos en una variedad de pepino cv. Beit Alpha sin resistencia al virus (Lecocq y col. 2000). La elevada homogeneidad de los cultivos y la alta especificidad que suelen tener las resistencias, así como el desconocimiento que se tiene sobre la variabilidad de CVYV, eleva el peligro que puede representar la introducción de variantes virales procedentes de otras zonas en nuestros cultivos.

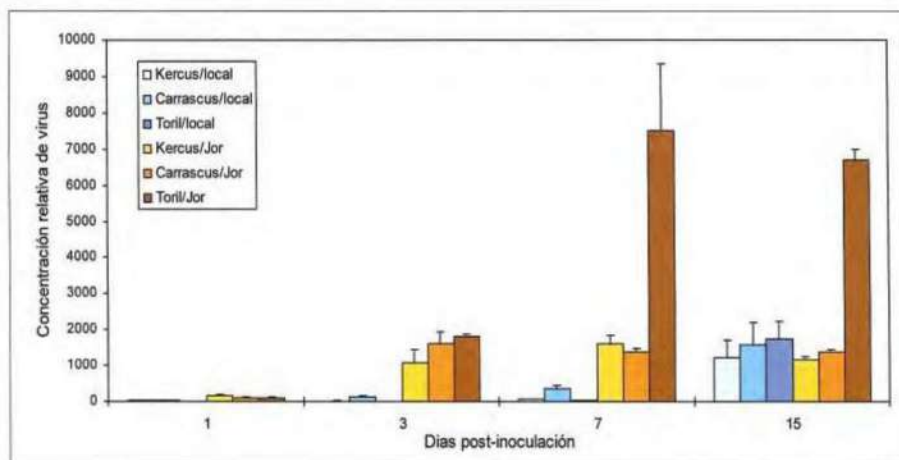


Figura 2. Cambios en la concentración del aislado de CVYV de Jordania y del aislado local en las variedades de pepino Kercus®, Carrascus® y Toril® a los 1, 3, 7 y 15 dpi. Las barras representan el error estándar de la media.

En este trabajo hemos caracterizado en mayor profundidad este aislado jordano de CVYV, hemos estudiado su comportamiento en variedades locales de pepino con diferentes grados de resistencia y hemos avanzado en el conocimiento del origen de la enfermedad.

Comportamiento del aislado virulento de CVYV en variedades comerciales de pepino resistentes a CVYV

Estudiamos el comportamiento de este aislado Jordano y lo comparamos con un aislado local,

para monitoreo, confusión sexual
y captura masiva.

Tuta absoluta

MONITOREO

- Dispositivo para detectar la presencia de adultos mediante trampas y feromonas del tipo *Delta* con fondo engomado para estimar el posible riesgo de daños.
- Instalación de 3 a 4 trampas por hectárea situadas por encima del cultivo.
- Control de trampas 1 vez por semana.
- Renovación de atrayentes cada 6 semanas.

CAPTURA MASIVA

- Dispositivo para el control de la plaga mediante trampas del tipo *Water Trap*.
- Instalación de 15 a 30 trampas por hectárea situadas a 20-50 cm del suelo, en el interior y exterior de la parcela.
- Refuerzo de las zonas de capturas más elevadas reduciendo a 25 m la separación entre trampas.
- Aplicación durante todo el desarrollo de la planta.

OpenNatur, todo tipo de trampas y accesorios.
Soluciones agrobiológicas especialmente recomendadas en producción integrada (PI) y producción ecológica.

Open
Natur

Empresa de Soluciones
Agrobiológicas

recogido en Almería, infectando 10 variedades de pepino con diferentes grados de resistencia, según describían las compañías de semillas que los comercializaban: Alcazaba®, Ebano®, Grizzly®, Panda® and Toril® (Seminis Vegetable Seeds, Oxnard, US), Carrascus®, Kercus® and Paramos® (De Ruiter Seeds, Bergschenhoek, The Netherlands) y Borja® y Primo® (Enza Zaden B.V., Enkhuizen, The Netherlands) (Tabla 1). Los síntomas se evaluaron siguiendo una escala de valores del 0 al 3, en el que 0 correspondía a ausencia de síntomas, 1 a moteado suave, 2 a clorosis nervial y moteado de intensidad media y 3 a clorosis nervial intensa, distorsión foliar y enanismo de la planta. Los aislados se inocularon mecánicamente en 10 plantas de cada una de las variedades que se mantuvieron en una cámara de cultivo en condiciones de temperatura y luz controlada. La observación de síntomas se realizó hasta 15 días después de la inoculación (dpi), momento en el que se estabilizó la intensidad de los mismos. El aislado Jordano indujo síntomas más intensos que el aislado local en todas las variedades de pepino, salvo en la variedad susceptible Toril®, en la que ambos indujeron síntomas muy intensos (con valores medios de 3) (Figura 1) (Tabla 1). En los cultivares de pepino descrito como altamente resistente al virus (Carrascus®, Kercus®, Ebano®, Paramos® y Primo®) los valores medios de los síntomas inducidos por el aislado Jordano variaban de 1.4 (intensidad media) a 2.7 (intensidad alta) mientras que en las plantas inoculadas con el aislado local estos valores oscilaron entre 0.0 (plantas sin síntomas) y 1 (intensidad baja). En este grupo de variedades, las mayores diferencias de intensidad de síntomas observadas entre el aislado Jordano o el local se registraron en las plantas de Paramos®, con valores medios de 2.7 y 0.6, respectivamente. Con respecto a las variedades descritas con resistencia intermedia a CVYV (Alcazaba®, Panda®, Grizzly® y Borja®), las diferencias de la sintomatología inducida por ambos aislados fue muy clara: las plantas de Panda® inoculadas con el aislado jordano mostraron valores medios de síntomas de 3 mientras que las inoculadas con el aislado local mostraron valores medios muy bajos, de 0.1. En el caso de las variedades Grizzly® y Alcazaba®, el aislado local no indujo síntoma alguno y por el contrario, el aislado jordano indujo síntomas con valores medios de 2.0 y 3.0, respectivamente. Finalmente, las plantas de la variedad Borja® también mostraban intensidades de síntomas muy diferentes con valores medios de 3.0 para el aislado Jordano y de 1.4 para el aislado local.

Variedad	Resistencia ^a	Intensidad de síntomas ^b	
		Local	Jordania
Toril®	Susceptible	3.0	3.0
Panda®	Media	0.1	3.0
Grizzly®	Media	0.0	2.0
Alcazaba®	Media	0.0	3.0
Borja®	Media	1.4	3.0
Paramos®	Alta	0.6	2.7
Ébano®	Alta	0.8	1.8
Kercus®	Alta	1.0	2.0
Carrascus®	Alta	1.0	2.0
Primo®	Alta	0.0	1.4

^a Nivel de Resistencia registrado por las respectivas compañías de semillas.

^b Media de los valores de intensidad de síntomas en las plantas infectadas.

Tabla 1. Intensidad de síntomas observados en plantas de variedades comerciales de pepino inoculadas con el aislado de CVYV de Jordania y el aislado local.

Cuantificación del aislado Jordano de CVYV en cultivares de pepino

Para comprobar si las diferencias de virulencia observadas entre el aislado local de CVYV y el de Jordania estaban correlacionadas con diferencias en la tasa de multiplicación de ambos aislados se llevó a cabo la cuantificación del virus en plantas de las variedades Kercus® y Carrascus®, descritos como altamente resistente al virus, y en plantas susceptibles de la variedad Toril®. Se inocularon 10 plantas de cada variedad con cada uno de los aislados y se recogieron muestras para ser analizadas a 1, 3, 7 y 15 dpi (t_1 - t_4). La cuantificación se realizó mediante PCR en tiempo real con el procedimiento descrito por Gil-Salas y sus colaboradores (2007 y 2009). Los valores de las concentraciones virales se normalizaron con respecto a los obtenidos en un tiempo inicial (t_0) en plantas inoculadas con el aislado local. Los datos obtenidos en este experimento mostraron que el aislado de Jordania se acumulaba antes que el aislado local en las plantas de los tres cultivares, aunque finalmente alcanzaban valores equivalentes en las plantas resistentes (Figura 2). Los análisis estadísticos no mostraron

diferencias significativas en el comportamiento de los tres cultivares inoculados con el aislado local de CVYV, mientras que sí mostraron diferencias en el comportamiento de los cultivares resistente con respecto al susceptible en el caso del aislado de Jordania. En cualquier caso, sí se apreció una diferencia clara en el comportamiento de ambos aislados en las tres variedades empleadas en este ensayo (GALIPIENSO y col. 2012A).

Análisis molecular del aislado Jordano

Hemos obtenido la secuencia completa del genoma del aislado jordano (JF460793) y se ha comparado con la secuencia genética de un aislado local del virus (AY578085) (GALIPIENSO y col. 2012B). Los resultados del análisis demostraron que ambos aislados tenían una identidad nucleotídica y aminoácídica en la región codificante del 94 y 96%, respectivamente. Los cambios afectaban en mayor o menor medida a todas las proteínas virales, pero destacaban varios cambios localizados en una región funcional de la proteína 1b y en un punto de procesamiento proteolítico de las proteínas P1-P3 (GALIPIENSO y col. 2012A). Se sabe que la proteína

1b tiene la función de supresor de silenciamiento génico postranscripcional, que es un mecanismo de defensa fundamental de las plantas (VALLI y col. 2008) y también se conoce la implicación de la proteína P3 en la inducción de sintomatología en plantas infectadas por otros miembros de la familia *Potiviridae* (WEN y col. 2011). Por lo tanto, alguno de estos cambios podrían estar implicado en el aumento de la virulencia que muestra el aislado de Jordania con respecto al los aislados locales de CVYV en las plantas de pepino.

Los análisis filogenéticos llevados a cabo con secuencias genéticas de aislado de CVYV de diferentes países (España, Francia, Portugal, Túnez, Israel y Líbano) disponibles en las bases de datos mostraron que los aislados europeos formaban parte del mismo grupo que estaba bien diferenciado del resto de aislados procedentes de otras partes del mundo. Esto estaba en concordancia con los resultados obtenidos por Janssen y col. 2007 y sugería que CVYV se habría dispersado por Europa a partir de una única introducción y además esta habría sido reciente. Estos análisis también situaban el origen del virus en la zona de Oriente Próximo, lugar de procedencia del aislado Jordano con el que estábamos trabajando.

Conclusiones

En este trabajo se ha comprobado que el aislado de CVYV procedente de Jordania induce síntomas más

severos que un aislado local de CVYV recogido en Almería en variedades de pepino comercializadas con diferentes grados de resistencia al virus. El análisis molecular realizado mostró importantes diferencias genéticas entre los dos aislados por lo que, junto con las diferencias biológicas observadas, ambos aislados podrían ser considerados como dos razas diferentes de CVYV. Los análisis filogenéticos realizados apoyan esta hipótesis, además de situar el origen del virus en la zona de oriente próximo a partir del cual se extendió por los distintos países de la cuenca mediterránea. En Europa, el virus se habría extendido a partir de una única introducción y ésta habría sido en fechas recientes, probablemente cuando se detectó por primera vez en España. Finalmente, los ensayos de cuantificación viral realizados con las variedades de pepino Kercus®, Carrascus® y Toril® no mostraron una relación clara entre expresión de síntomas y concentración viral, pero sí pudo observarse un comportamiento diferente de ambos aislados en las tres variedades. Este resultado apoya la hipótesis de que probablemente alguno de los cambios observados en la secuencia genética del aislado de Jordania, sobre todo los que afectaban a las regiones descritas anteriormente podrían producir el aumento de virulencia de este aislado. Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran lo dañino que sería la dispersión de un aislado de CVYV de este tipo en los cultivos de pepino, muy importantes desde el punto de vista económico en el sureste

español. Por lo tanto, creemos que es necesario seguir avanzando en el conocimiento de la variabilidad de los aislados de CVYV y seguir buscando fuentes de resistencia que sean efectivas contra el mayor grupo de aislados posible. La obtención de la secuencia genética completa del aislado severo de Jordania y la comparación con la de un aislado local suave nos brinda la posibilidad de estudiar con mayor profundidad los determinantes genéticos relacionados con la patogenicidad del virus.

Agradecimientos: Queremos mostrar nuestro agradecimiento al Dr. Juan José López Moya por habernos proporcionado el aislado de CVYV de Jordania. Este proyecto ha sido financiado en parte por el proyecto PTR1995-0803-OP del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- CUADRADO IM, JANSSEN D, VELASCO L, RUIZ-GARCIA L, SEGUNDO E (2001). First Report of Cucumber vein yellowing virus (CVYV) in Spain. *Plant Disease* 85: 336
- GALIPIENSO L, JANSSEN D, RUBIO L, ARAMBURU J, VELASCO, L (2012A). Cucumber vein yellowing virus isolate-specific expression of symptoms and viral RNA accumulation in susceptible and resistant cucumber cultivars. *Crop Protection* [DOI: 10.1016/j.cropro.2012.08.004]
- GALIPIENSO L, RUBIO L, ARAMBURU, J, VELASCO L, JANSSEN D (2012B). Complete nucleotide sequence of a severe isolate of Cucumber vein yellowing virus from Jordan. *Archives of Virology* 157: 1189-1192
- GIL-SALAS FM, MORRIS J, COLYER A, BUDGE G, BOONHAM N, CUADRADO IM, JANSSEN D (2007). Development of real-time RT-PCR assays for the detection of Cucumber vein yellowing virus (CVYV) and Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Journal of Virological Methods* 146: 45-51
- GIL-SALAS FM, COLYER A, BOONHAM N, CUADRADO IM, JANSSEN D (2009). Resistance screening against Cucumber vein yellowing virus using a real-time (Taqman®) RT-PCR assay in cucumber (*Cucumis sativus*). *Crop Protection* 28: 109-12
- JANSSEN D, VELASCO L, MARTÍN-BRETONES G, SEGUNDO E, CUADRADO IM (2007). Low genetic diversity among Cucumber vein yellowing virus isolates from Spain. *Virus Genes* 34: 367-71.
- LECOQ H, DESBIEZ C, DELÉCOLLE B, COHEN S, MANSOUR A (2000). Cytological and molecular evidence that the whitefly-transmitted Cucumber vein yellowing virus is a tentative member of the family Potyviridae. *Journal of General Virology* 81: 2289-93
- VALLI A, DUJOVNY G, GARCÍA JA (2008). Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from Cucumber vein yellowing ipomovirus. *Journal of General Virology* 82: 974-986
- WEN RH, MAROOF MAS, HAJIMORAD MR (2011). Amino acid changes in P3, and not the overlapping pipo-encoded protein, determine virulence of Soybean mosaic virus on functionally immune Rsv1-genotype soybean. *Molecular Plant Pathology* 12: 799-807